



Inseminação Artificial de Suínos: Inseminar duas vezes durante o estro é suficiente?

Paulo Roberto Souza da Silveira¹
Robson José Cesconeto²
Eraldo L. Zanella³

Na espécie suína o momento de realização da inseminação é primordial para a obtenção de um bom resultado de fecundidade e de prolificidade. A ovulação tem sua ocorrência estimada na fêmea nulípara de 24 a 36h e na múltipara de 33 a 39h, após o reflexo de imobilização da fêmea, embora esteja evidente que existe uma grande variação associada ao momento ovulatório.

Para conseguir-se um melhor desempenho reprodutivo, a inseminação artificial (IA) deve ser realizada, de preferência, até 24 horas antes do momento da ovulação (Nissen et al., 1997; Soede et al., 1995) sendo recomendado o uso de duas ou mais inseminações, durante um mesmo estro (Afonso et al, 2001; Steverink, 1999; Xue et al. 1998). O uso de duas ou mais inseminações por estro em cada fêmea decorre da duração relativamente longa do cio, com horários de ovulação muito variáveis (Steverink, 1999). Embora seja muito utilizada a prática de inseminar duas vezes no mesmo cio, pouco se conhece sobre a importância e a contribuição de cada uma das doses na geração da leitegada resultante dessas inseminações.

Avaliação do efeito de duas doses inseminantes na composição da mesma leitegada suína:

Para o estudo da influência individual das doses inseminantes na composição da leitegada, com a aplicação de duas doses de sêmen, foram inseminadas 50 fêmeas suínas de ordem de parto entre 3 e 5, que demonstraram estro entre 3 e 5 dias após o desmame.

As fêmeas foram submetidas a 2 diagnósticos de estro por dia, com o auxílio de macho sexualmente maduro, considerando-se o início do cio e o primeiro reflexo de tolerância ao teste de pressão lombar na presença do macho (TPL). Como doadores de sêmen foram utilizados um macho da raça Duroc (macho A) e um da raça Pietran (macho B). Para determinar a influência individual das doses inseminantes na composição da leitegada, utilizou-se o sêmen de um dos machos na primeira inseminação e do outro na segunda inseminação, e vice-versa. Para maior controle experimental, foram inseminados grupos de fêmeas com as duas doses do mesmo macho e grupos de fêmeas com inseminações com doses heterospermicas, conforme delineamento experimental. As fêmeas foram

¹Méd. Vet., D.Sc., Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves.

²Méd. Vet. MSc.

³Professor da FAMV-UPF

inseminadas em um protocolo de duas inseminações com a primeira dose aplicada 12 h após o início do estro e a segunda 24 h após a primeira, de acordo com os tratamentos idealizados (Tabela 1).

Tabela 1 – Delineamento experimental.

Tratamento	Nº de Fêmeas	Macho 1ª IA	Macho 2ª IA
I	10	A	
II	10	B	B
III	10	A	B
IV	10	B	A
V	10	A/B	A/B

Após as parições, para a definição do cachaço do qual cada leitão era descendente, procedeu-se um teste de identificação da paternidade que foi baseado na análise dos microssatélites (Stahlberg, 1996, Ellegren et al., 1993) de acordo com os protocolos de extração de DNA, amplificação das seqüências de microssatélites e coloração de gel de eletroforese com prata, sugeridos na literatura (Reginato et al., 2001; Sambrook et al., 2002).

A contribuição de cada dose inseminante, foi determinada pela comparação das médias de nascidos de cada inseminação, através do procedimento ANOVA (SAS INSTITUTE INC., 2001).

Resultados

Das 50 leitegadas obtidas com a aplicação dos tratamentos, foram submetidos à identificação, todos os animais dos tratamentos III, IV e V. Dos tratamentos I e II, foi submetida à identificação uma leitegada completa (escolhidas por sorteio), de cada um, para a validação da técnica. Os exames de paternidade do experimento totalizaram 453 animais. Onze animais não puderam ser identificados por diferentes motivos.

Dos 442 animais identificados, 268 foram produto da aplicação dos tratamentos III e IV, sendo 131 filhos do macho A e 137 do macho B, e 151 leitões eram provenientes do tratamento V (75 filhos do macho A, e 76 do macho B), 14 animais eram produto de inseminações homospérmicas com o sêmen do macho A e 9 do macho B. Estes números não diferiram estatisticamente através da análise de variância e teste T. Nos dados dos tratamentos com inseminações homospérmicas (I e II) e heterospérmicas (V), deve ser ressaltada a similaridade de poder fecundante entre os dois machos, não existindo nenhum macho "dominante", capaz de gerar um viés na interpretação desses resultados.

Tabela 2 – Média de Nascidos Totais por Tratamentos

Tratamento	N	Média de Nascidos	Desvio Padrão	Max	Min
I	10	16,3 ^a	± 2,58	19	10
II	10	14,9 ^a	± 3,85	20	6
III	10	13,2 ^a	± 3,84	19	8
IV	10	15,0 ^a	± 4,37	21	7
V	10	15,3 ^a	± 3,91	23	10

Médias com as mesmas letras não diferem estatisticamente ($\alpha = 0,05$).

I e II -Inseminação homospérmica com o macho A e B respectivamente, III e IV -Primeira Inseminação com macho A e a segunda com o macho B e vice versa. V - Inseminação com "pool" de sêmen dos dois machos.

Os resultados do protocolo com duas IA (Tabela 2) evidenciam altas médias de nascidos totais demonstrando a eficiência desse esquema de inseminação, além da alta prolificidade das fêmeas e da excelente fertilidade dos cachaços. Ao comparar-se esses resultados com dados contemporâneos do rebanho, não surpreende que, sob condições controladas de experimento com poucos animais, tenha-se obtido resultados até superiores aos de rotina do rebanho no mesmo período (Tabela 3). Isto pode ser justificado pelo extremo zelo na realização das tarefas de diagnóstico do cio, inseminação artificial e controle na estocagem do sêmen.

Analisando a influência de cada dose de sêmen na composição das leitegadas, a segunda dose de sêmen, contribuiu, em termos gerais, com a maioria dos animais nascidos (Tabela 4). Esta observação pode ser explicada pelo fato de que, na espécie suína a ovulação se dá no terço final do estro (Soede & Kemp, 1996). Desta forma, pode-se supor que no momento em que ocorreu a ovulação, o número de espermatozoides capazes de fertilizar, infundidos na 1ª inseminação (12 h após o início do TPL), fosse menor que o número de espermatozoides da 2ª inseminação (36 h após o início do TPL). Segundo Hunter, (1982) a vida média dos espermatozoides é de aproximadamente 24 h na IA podendo chegar a 36 h (Steverink et al., 1997), levando em conta que a perda da capacidade fertilizante é um fenômeno gradativo (Hafez, 1982). Em concordância com este fato, uma análise intra-leitegada demonstra que 85% das porcas tiveram grande parte, acima de 51% dos leitões provenientes da 2ª inseminação e que somente 15% das porcas tiveram a maioria ou a totalidade dos leitões filhos 1ª inseminação.

Na Fig. 1 pode ser observado que 80% das leitegadas tinham animais filhos oriundos de ambas as inseminações (leitegadas com paternidade mista) e que somente 20% das leitegadas eram compostas por animais nascidos de somente uma das inseminações. Este alto percentual de leitegadas mistas, demonstrou

Tabela 3 – Número médio de nascidos com duas e três inseminações

Tratamento	N	Número de Nascidos	Desvio Padrão	Max	Min
3 Inseminações (12,24,36)	50	13,60 ^a	± 3,75	22	5
2 Inseminações (12,36)	50	14,94 ^a	± 3,74	23	6

Médias com as mesmas letras não diferem estatisticamente ($\alpha=0,05$).

Tabela 4 – Número de nascidos vivos para cada dose inseminante, para os tratamentos com alternância de machos entre a 1ª e 2ª inseminação (tratamentos III e IV).

Tratamento	Primeira Inseminação		Segunda Inseminação	
	Nascidos	Frequência (%)	Nascidos	Frequência (%)
III	46 ^b	35,6	83 ^a	64,34
IV	43 ^b	33,8	84 ^a	66,14
Total de Nascidos	89 ^b	34,8	167 ^a	65,23

Tratamentos III e IV -Primeira Inseminação com macho A e a segunda com o macho B e vice versa. Valores com mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente $\alpha=0,05$.

que o protocolo de duas IA, esquematizadas dessa forma (h12/h36) após a detecção do estro, possibilitou que no horário em que ocorreu a ovulação para cada porca, havia uma ótima "oferta" de espermatozoides viáveis oriundos de ambas as IA, pelo menos para o padrão de duração do estro do rebanho utilizado.

muito difícil evitar defasagem no tamanho da leitegada para fêmeas com cio muito curto ou demasiado longo. Possivelmente, isto se explique pelo fato de que em algumas das fêmeas com cio excessivamente curtos ou muito longos, apenas uma IA consiga contribuir para a fertilização dos óvulos e assim mesmo já fora do período de máxima viabilidade do espermatozoides inseminado.

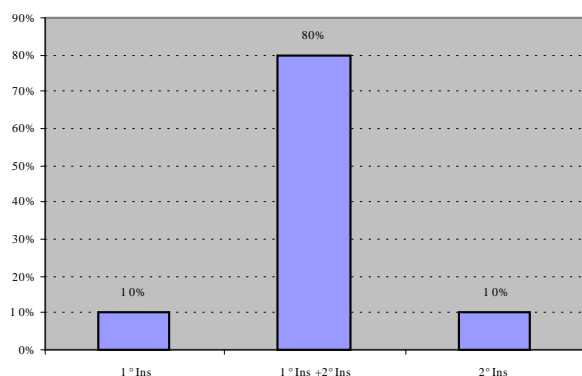


Figura 1 – Frequência de leitegadas com animais somente da 1ª inseminação, somente da 2ª inseminação e de ambas as inseminações (leitegadas mistas).

Quando analisamos a relação entre a duração do cio (DC) e o número de nascidos por parto (Fig. 2), observamos uma leve tendência ($r^2=5,25\%$) de aumento de nascidos a medida que aumenta da duração do cio até um determinado limite, com subsequente redução neste número para as fêmeas que apresentaramaios mais longos (até 4 dias). Isto demonstra que o ideal seria ocorrer uma menor dispersão (com maior padronização) na duração dosaios nos grupos de porcas porque, com protocolos de duas IA, torna-se

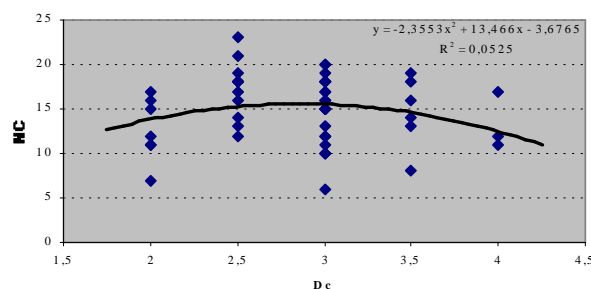


Figura 2 – Gráfico de correlação entre a duração do cio e o número total de nascidos.

Na Fig. 3, que ilustra o número médio de nascidos, como resultado de cada dose inseminante em relação a duração do estro, tem-se que, com o aumento na duração do cio entre 2 e 3 dias, houve também um aumento no número médio de nascidos da 2ª inseminação, em relação aos da 1ª inseminação, com tendência a estabilizar a partir daí.

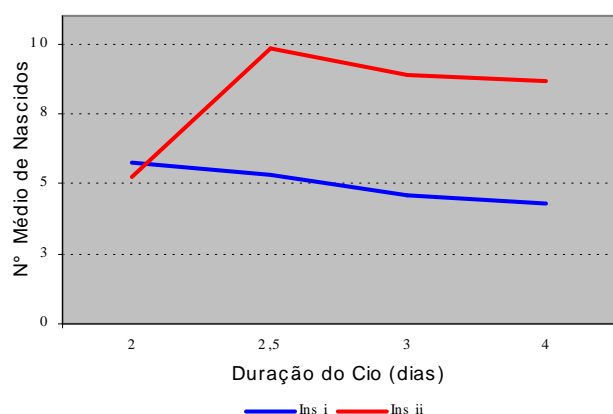


Figura 3 – Distribuição do número médio de nascidos da 1ª e 2ª inseminações em relação a duração do cio.

Finalmente, pode ser inferido que nas leitegadas com filhos somente da primeira IA a ovulação deve ter ocorrido não muito distante do início do cio (estros curtos - ovuladoras precoces), as quais, de acordo com Weitze & Waberski (1994), podem chegar até $\pm 10\%$ das fêmeas em cio. Por outro lado, nos 10% de leitegadas com produtos somente da segunda inseminação a ovulação deve ter ocorrido muito distante do início do estro (estros longos - ovuladoras tardias - 10 à 12% das fêmeas do rebanho de acordo com Weitze & Waberski (1994), Viana (2001) e Castangna et al (2001).

Os dados colhidos neste experimento não se assemelham aos relatados por outros autores (Vesseur et al., 1996), que obtiveram taxas de 34%, 26% e 40% para leitegadas com nascidos somente da 1ª dose inseminante, somente da 2ª dose inseminante e de ambas as doses, respectivamente, quando analisaram fêmeas de ordem de parto entre 3 e 5. Confrontam também com os dados obtidos pelo mesmo autor, para fêmeas com um IDC de 4 dias, que representaram 90% das fêmeas do presente experimento. Para esta categoria de IDC, Vesseur e colaboradores encontraram, 24% das leitegadas com leitões exclusivamente da 1ª dose inseminante, 36% das leitegadas com leitões exclusivamente da 2ª dose inseminante, 40% das leitegadas com animais de ambas as doses (leitegadas mistas). Estes dados mostram claramente uma diferença no padrão de duração do estro e horário ovulatório entre os rebanhos estudados, possivelmente devido à fatores de ordem genética, de manejo e ambiente.

Conclusões

Pela análise dos dados obtidos, nas condições de manejo, linhagem genética e protocolo de inseminação artificial utilizados no experimento, é possível concluir que:

- O protocolo de inseminação artificial utilizado foi satisfatório, pois pela alta eficiência reprodutiva vista nos resultados, permitiu maior confiabilidade nas comparações estabelecidas entre a 1ª e 2ª dose inseminantes.
- Nas condições experimentais, a 2ª dose inseminante é a responsável pela maior parte dos leitões nascidos, na maioria das leitegadas.
- Por estar presente na composição de 90% das leitegadas, a primeira dose inseminante manteve uma contribuição essencial para a maximização da prolificidade, da taxa de concepção e parição das fêmeas estudadas.
- A 1ª e 2ª doses inseminantes contribuíram conjuntamente para a formação das leitegadas (80% dos partos), mesmo considerando o intervalo de 24 h entre elas.
- A análise de microssatélites é uma metodologia prática e precisa para a identificação individual de suínos, podendo ser utilizada em qualquer experimento que necessite da identificação da paternidade nesta espécie animal.

Agradecimentos

Agradecemos a Empresa Sadia S/A por permitir a realização do experimento em sua unidade experimental; ao Centro de Biotecnologia da UFPEL pelo apoio na realização da etapa laboratorial do experimento e a Embrapa Suínos e Aves conjuntamente com o Depto. de Zootecnia da UFPEL, pelo financiamento do projeto.

Referencias Bibliográficas

- AFONSO, J.B.A., LUCIA, T.Jr.; CORREA, M.N.; DESCHAMPS, J.C.; RECH, D.C., SERRET, C.G. Efeito da frequência de inseminações artificiais por cio sobre o desempenho reprodutivo de porcas desmamadas precocemente. In: X Congresso da ABRAVES 2001, Porto Alegre. Resumos: X Congresso da ABRAVES, Porto Alegre, RS. 2001 p. 267-268
- ELLEGREN, H.; JOHANSSON, M.; CHOWDHARY, B.P.; MARKLUND, S.; RUYTER, D.; MARKLUND, L.; BRÄUNER-NIELSEN, P.; EDFORDS-LILJA, I.; GUSTAVSSON, I.; JUNEJA, R.K.; ANDERSON, L. 1993. Assignment of 20 microsatellite markers to the porcine linkage map. *Genomics*, n. 16, p. 431-439, 1998.

REGINATO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília, EMBRAPA Informação Tecnológica, 2001. p. 215.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MARTINS, T. *Molecular Cloning, laboratoty manual*, 3rd, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2002.

SAS INSTITUTE INC. *System for Microsoft Windows*. Release 8.01. Cary: NC, USA, 2001 - CD ROM.

SOEDE, N.M.; WETZELS, C.C.H.; ZONDAG, W.; de KONNING, M.A.I.; KEMP, B. Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 104, p. 99-106, 1995.

STAHLBERG, R. 1996. *Vaterschaftsnachweis an Embryonen mit polymorphen DNA-Markern zur Fertilitätsbeurteilung von Ebern nach heterospemer Insemination*. Hanover, 1996. 95ff. Tese (Doutorado em Veterinária) Tierärztliche Hochschule Hannover, 1996.

STEVERINK, D. *Optimizing insemination strategies in pigs*. Wageningen, 1999, 174ff. Tese (Doutorado em Veterinária) Wageningen University, 1999. 11. XUE, J.; DIAL, G.D.; TRIGG, T.; DAVIES, P.; KING, V.L. Influence of mating frequency on sow reproductive performance. *Journal of Animal Science*, v 76, p. 2962-2966, 1998.

VIANNA, C.H.C. **Avaliação dos intervalos inseminação - ovulação e desmame - cio e da duração do cio como parâmetros na determinação de programas alternativos de inseminação artificial em suínos**. São Paulo, 76 ff. Tese (Doutorado em Reprodução Animal), Universidade de São Paulo, São

Paulo. 2001.

VESSEUR, P.C.; KEMP, B.; den HARTOG, L.A. Factors influencing the proportion of offspring from a second insemination in sows. **Animal Reproduction Science**. n. 41, p. 255 - 265, 1996.

WEITZE, K.F.; WABERSKI, D. Artificial Insemination in pig farms. **Reproduction in Domestic Animals**, u.51, n.5, p.374 -375, 1994.

CASTAGNA, C.D.; PEIXOTO, C.H.; MARCHETTI, A.N.; DIAS, C.P.; BORTOLOZZO, F.P. Influência do Intervalo Desmame Estro na Duração Estro e no momento da ovulação em dois Rebanhos Suínos. In: X Congresso da Abraves, 10, 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Abraves, 2001, p.263-264.

SOEDE, N.M.; KLEMP, B. Oestrus expression and timing of ovulation in pigs. **Journal of Reproduction and Fertility (suppl.)** n. 52, p.79-89, 1997.

HAFEZ, E.S.E. Transporte e sobrevivência dos gametas. In: HAFEZ, E. S.E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Editora Manole. 1982.p. 229-253.

HUNTER, R.H.F. Interrelationships between spermatozoa, the female reproductive tract and the egg investments. In: COLE, D.F.A.; FOXCROFT, G.R. **Control of pig reproduction**. Butterworths, p.49-63. 1982.

STEVERINK, D.W.B., SOEDE, N.M., BOUWMANN, E.G., KEMP, B. Influence of insemination - ovulation interval and sperm cell dose on fertilization in sows. **Journal of Reproduction and Fertility**. n.111, p.165-171, 1997.

Comunicado Técnico, 360



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Suínos e Aves
Endereço: Caixa Postal 21, 89700-000, Concórdia, SC
Fone: (49) 442-8555
Fax: (49) 442-8559
Email: sac@cnpsa.embrapa.br

1ª edição
 1ª impressão (2004) tiragem: 100

Comitê de Publicações

Presidente: Paulo Roberto Souza da Silveira
Membros: Paulo Antônio Rabenschlag de Brum, Janice Reis Ciacci Zanella, Gustavo J.M.M. de Lima, Julio Cesar P. Palhares, Cícero Juliano Monticelli.

Expediente

Supervisão editorial: Tânia M.B. Celant.
Editoração eletrônica: Simone Colombo.
Normalização bibliográfica: Irene Z.P. Camera.